Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik,
Klinik A (Dir.: Prof. Dr. W. Schneider)
der Universität Düsseldorf

Elektrophoretische Untersuchungen zum Glycoprotein-Muster menschlicher Erythrozyten

Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

MARTIN SONNENBERG

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0048

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik,
Klinik A (Dir.: Prof. Dr. W. Schneider)
der Universität Düsseldorf

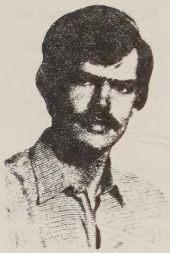
Elektrophoretische Untersuchungen zum Glycoprotein-Muster menschlicher Erythrozyten

Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

MARTIN SONNENBERG

1982



"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf"

der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. Schneider

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Schmidt

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	Seite 1
2. Abkürzungsverzeichnis	" 2
3. Ziel der vorliegenden Untersuchung	" 3
4. Bisheriger Kenntnisstand	" 3-17
4.1 Die normale Erythrozytenmembran	" 3-10
4.2 Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	" 10-12
4.3 Nabelschnurblut von Neugeborenen	" 12-14
4.4 Blut chronisch niereninsuffizienter Patienten vor der ersten Dialyse	" 14-17
5. Material und Methoden	" 18-23
5.1 Chemikalien	" 18
5.2 Präparation der Erythrozyten-Membranen	" 18-19
5.3 Proteinbestimmung nach Lowry	" 19
5.4 Gel-Herstellung	" 19-20
5.5 Gel-Elektrophorese	" 20-21
5.6 Querelektrophorese	" 21-22
5.7 Coomassie-BB Färbung	" 22
5.8 PAS-Färbung	" 22-23
5.9 Hb-F Färbung	" 23
6. Ergebnisse	" 24-32
7. Diskussion	" 33-36
7.1 Zusammenfassung	" 36
8. Literaturverzeichnis	" 37-57

2. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
C3	Komplement-Komponente 3
Coomassie BB	Coomassie Brilliant Blau-Färbung
dest.	destilliert
EDTA	Äthylendiamino-tetraessigsäure
Erys	Erythrozyten
et al.	et alii = und andere
G3PD	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Hb-F	fetales Hämoglobin
HCl	Salzsäure
He La-Zellen	Name einer best. Zellkultur
konz.	konzentriert
2-ME	2-Mercapto-Äthanol
PAS	Perjod-Säure Schiffs-Reagenz-Färbung
PNH	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
SDS	Dodecylsulfat
Tris	Hydroxymethylaminomethan
TEMED	Tetramethyläthylendiamin

3. Ziel der vorliegenden Untersuchung

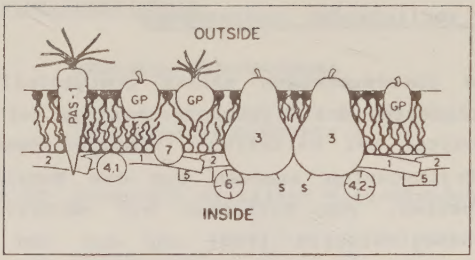
Durch diese Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob eine Veränderung des Glycoproteinmusters der Membranen von Erythrozyten bei verstärkter Hämolyse festzustellen ist. Die Erythrozyten stammen aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen, von Patienten mit nächtlicher paroxysmaler Hämoglobinurie (PNH) und aus dem Blut von urämischen Patienten, das vor der ersten Dialyse abgenommen wurde. Ihr Proteinmuster wurde durch Gel-Elektrophorese mit dem von Erythrozytenmembranen gesunder Erwachsener verglichen. Um die Bedeutung dieser Untersuchung verständlicher zu machen wird zuerst ein kurzer Überblick über den Kenntnisstand der Proteine der Erythrozytenmembranen gegeben. Anschließend werden die Befunde bei den oben genannten Erkrankungen aufgeführt, die im Zusammenhang mit dieser Untersuchung stehen.

4. Bisheriger Kenntnisstand

4.1 Die normale Erythrozytenmembran

Tabelle der bekannten Membranproteine

Bande	Lage zur Membran	Molekulargewicht in Dalton	Namen
1	extrinsic	240000	Spektrin 1
2	extrinsic	220000	Spektrin 2
3	intrinsic	110000	Anionen-Kanal
4.1	extrinsic	88000	
4.2	extrinsic	80000	
5	extrinsic	47000	Aktin
6	extrinsic	39000	G3PD
7	intrinsic	32000	
PAS-1	intrinsic	83000	Glycophorin 1
PAS-4	intrinsic	70000	
PAS-2	intrinsic	45000	Glycophorin 2
PAS-3	intrinsic	25000	



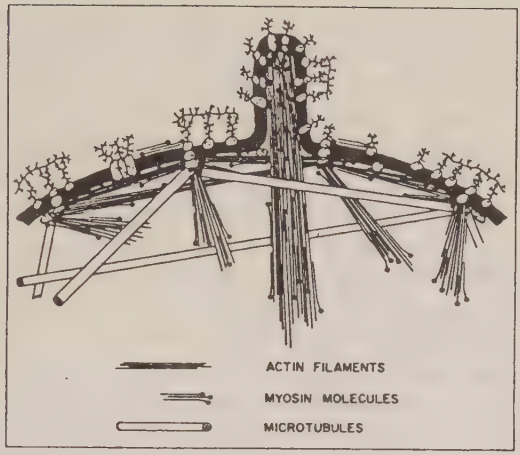
Schematische Darstellung der menschlichen Erythrozyten Membran. GP: Glycoprotein; PAS-1: Glycophorin; die Nummerierung der Proteine von 1 - 7 hat ihren Ursprung in der Wanderung bei der SDS-Gel-Elektrophorese.
WEINSTEIN (1978)

Als einfaches Modell erfreute sich in den letzten Jahren die Erythrozytenmembran großer Beliebtheit, obwohl diese Membranen aus Zellen ohne Kern und nur geringer Biosynthese stammen. Ihre Beliebtheit beruht auf ihrer einfachen Isolierbarkeit und fast unbegrenzten Verfügbarkeit.
Eine intakte Membran ist wesentlich für die Lebensdauer der Erythrozyten. Für die Stabilität der Membran wiederum sind neben den Membranproteinen (s.u.) das Hämoglobin, das sich an der Innenseite der Membran anlagert und die im Blutplasma befindlichen Lipide von Bedeutung, die sich mit den Lipiden in der Membran in ständigem Austausch befinden.
Große Anstrengungen auf dem Gebiet der Membranforschung wurden darauf verwandt, die Membranproteine zu charakterisieren. Dabei wurden am methodisch zugänglicheren Modell der Erythrozytenmembran Erkenntnisse gewonnen, die zu neuen Theorien und Vorstellungen über Struktur und Funktion der Zellmembran und ihrer Bestandteile führten. (s.Bild S. 4)
Acht Hauptpolypeptidketten konnten durch SDS-Gel-Elektrophorese von FAIRBANKS et al.(1971) beschrieben werden.

Es war aber wahrscheinlich, daß es zusätzlich in der Membran noch andere Peptidketten gibt. So wurden später aus der Gruppe der Membranenzyme z.B. die ATP-asen und die Acetylcholinesterase nachgewiesen. Sie sind funktionell sehr wichtig, gehören aber mengenmäßig zu jener kleinen Gruppe, die nicht mit der Gel-Elektrophorese nachweisbar ist. Diese Proteine wurden lediglich durch ihre enzymatische Aktivität entdeckt.
Außerdem gibt es eine große Anzahl von Glycoproteinen in der Erythrozytenmembran, die nicht den vier PAS-gefärbten Banden der Gel-Elektrophorese entsprechen. Diese uncharakterisierten Glycopeptide konnten vor einiger Zeit ebenfalls durch enzymatische Techniken nachgewiesen werden (GHAMBERG et al.1973 und von STECK et al.1974).
Mit der Technik der Gel-Elektrophorese wird also nur ein Teil der Membranproteine erfaßt. Das jetzige Wissen über diese Proteine wird im folgenden dargelegt.
Näheres Verständnis der Beziehung der Proteine zur Membran brachten die Forschungen von SINGER et al.(1972), die die leicht ablösbaren Extrinsic-Proteine (Bande 1,2,4,5,6) von den Intrinsic-Proteinen (Bande 3,7, PAS-1,2,3,4) trennten. Die Intrinsic-Membranproteine durchziehen die Membran, wärend die Extrinsic-Membranproteine nur der Membran anliegen. Mit den Methoden nach BERG (1969), BRETSCHER (1971) und REICHSTEIN et al.(1975) ließ sich zeigen, ob Proteine Kontakt zur Außenseite der Membran haben oder nicht. Weiterhin bewiesen STECK et al.(1971), BENDER et al.(1971) und TRIPLETT et al.(1972), daß die bedeutenden Extrinsic-Proteine der zytoplasmatischen Seite der Membran anliegen.
Näheres über die Morphologie der Membran und die Funktion der einzelnen Proteine der Erythrozytenmembran wurde 1979 von MARCHESI zusammengefaßt. (s. Bild S. 4)
Spektrine, die bei der Gel-Elektrophorese am langsamsten wandern und damit als Bande 1 und 2 erscheinen,

haben ein sehr hohes Molekulargewicht (Tab.S.3). BJERRUM et al. (1974) und KNÜFERMANN et al.(1974) fanden, daß Spektrine Aggregationsstufen einer bestimmten Polypeptidkette darstellen. Die große Bedeutung der Spektrine für die Fließeigenschaften der Zellmembran, die Zellform und damit auch für die Überlebenszeit der Erythrozyten wurde in einer großen Zahl von Studien nachgewiesen. PALEK et al.(1979) und SMITH et al.(1979) fanden einen direkten Zusammenhang zwischen dem Spektringehalt in der Membran und der Membrandeformierbarkeit und BEUTLER et al.(1981) fanden bei erleichterter Extrahierbarkeit von Spektrin eine entsprechend verkürzte Überlebenszeit. Interessant war die Entdeckung von GUIDOTTE (1972), daß Spektrin eine Ähnlichkeit mit dem Muskelmyosin-Molekül hat,das ein hohes Molekulargewicht besitzt. Ebenso wie beim Muskel spielen auch das Kalzium-Ion und eine Ca^{++}-abhängige ATPase eine Rolle. So hatte bei Untersuchungen von LORAND et al.(1979) eine Ca^{++}-Ansammlung einen irreversiblen Verlust an Membranbeweglichkeit zur Folge. Das gleiche Ergebnis erhielten PALEK et al.(1971) und CARRAWAY et al.(1975), wenn sie die Ca^{++}-abhängige ATPase Aktivität verminderten. In diesem Sinne kann man die hereditäre Sphärozytose als ein aufschlußreiches Experiment der Natur ansehen. FEIG et al.(1974) fanden bei dieser Störung einen Aktivitätsmangel an Ca^{++}-abhängiger ATPase und AMSDEN et al.(1972) glaubten, eine Schädigung der Membranmikrofilamente zu sehen. (s. Bild S. 7)

Nachdem Bande-5 als aktinähnlich charakterisiert wurde, drängte sich schon relativ früh ein Modell auf, bei dem Spektrin und Aktin ein kontraktiles Netzwerk bilden und so die ungewöhnliche Form des Erythrozyten erzeugen und aufrecht erhalten. In der neueren Forschung wurde dieses Modell weiter bestätigt und ausgebaut, z.B. von PUSZKIN et al.(1978) und von LUX (1979). Vervollständigt wurde das Modell des Zytoskelettes durch BENNET (1977;1979), der erkannte, daß das Protein der Bande-4,1



Das Zytoskelett, wie es sich nach den neuesten Forschungsergebnissen darstellt. ZWAAL (1982)

an Spektrin angeheftet ist. Da STECK (1974) schon vorher gezeigt hatte, daß das Protein der Bande-4 in der Nähe des zytoplasmatischen Teils des Proteins der Bande-3 liegen muß, war so der Fixpunkt des Zytoskelettes an der Membran gefunden.
Die Funktion des Bande-4,2 Proteins ist auch weiterhin unbekannt. Es soll auch in der Nähe des Bande-3-Proteins liegen.
Das letzte Extrinsic-Protein Bande-6 wurde von TANNER et al.(1971) und von CARRAWAY et al.(1972) als ein Enzym des Pentosephosphat-Zyklus, nämlich der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, erkannt.
Bei den Intrinsic Proteinen macht Bande-3 bei weitem den größten Anteil aus. STECK (1972) und WANG et al. (1974) konnten zeigen, daß das Protein der Bande-3 paarweise in der Membran liegt. Daß Bande-3 zu den Extrinsic Proteinen gehört, zeigen eindeutig SHIN et al.(1974) und JENKINS et al.(1975), indem sie den Kontakt

des Bande-3-Proteins mit der Außenseite der Membran nachweisen. Viele Bemühungen wurden unternommen, um dies mengenmäßig so stark vertretene Protein rein darzustellen. Mit verschiedenen Methoden erreichten dies TANNER et al.(1972), FINDLAY (1974) und FURTHMAYR et al.(1976). Die Funktion des Proteins der Bande-3 wurde zuerst durch den Hemmstoff Cytochalasin aufgedeckt. KLETZIEN et al.(1972) stellten durch Cytochalasin eine Hemmung der Zuckeraufnahme der Zellen fest. LIN et al.(1974) zeigten, daß sich Cytochalasin an der Membran anlagert. Erst CABATCHIK et al.(1974 und 1975) stellten den Zusammenhang zum Protein der Bande-3 her. Weiter wurde der Anionentransport von ROTHSTEIN (1975) und RAMJEESINGH et al.(1980) erforscht. Letztere zeigten, daß besonders die Protein-Segmente innerhalb der Membran mit dem Transport zu tun haben. Das Protein der Bande-3 soll demnach eine Art Tunnel durch die Membran bilden, durch die der Fluß der Anionen und des Zuckers stattfindet. Einige Autoren nehmen an, daß durch diesen Tunnel in der Membran den Anionen und dem Zucker auch das Wasser folgt. Das Protein der Bande-7 bleibt weiter uncharakterisiert, obwohl LUX et.al (1976) Hinweise dafür fanden, daß Bande-7 im Zusammenhang mit dem Spektrin-Aktin-Skelett steht.

Durch die PAS-Färbung konnten 4 weitere Proteinbanden von FAIRBANKS et al.(1971) sichtbar gemacht werden. Entscheidend für diese Proteine sind die Zuckerreste mit dem Sialsäuregehalt. Diese Glycoproteine bewirken durch ihre Zuckerreste die negative Ladung der Zelloberfläche. Außerdem sind sie von Bedeutung für die antigenen Membraneigenschaften und eventuell für den Membrantransport. Durch eine Alkalibehandlung fanden THOMAS et al. (1969), daß es sich wahrscheinlich bei den Zuckerresten um Tetrasaccharide handelt. Außerdem war schon der Zusammenhang mit den MN-Blutgruppenantigenen bekannt. EYLAR et al.(1962) zeigten, daß die Sialsäure an der Außenfläche der Membran liegt. Aber erst SPRINGER et

al.(1974) analysierten die Zuckerreste von PAS-1 und PAS-2. MORTON et al.(1973) nahmen infolge ihrer Untersuchungen an, daß PAS-1 ein Dimer von PAS-2 ist. Die Bedingungen der Konvertierbarkeit der beiden Banden erforschten FURTHMAYR et al.(1976) und SILVERBERG et al.(1978). Bis die genaue Struktur der PAS-Proteine 1 und 2 bekannt war, war es ein langer Weg. Schon 1969 nahmen WINZLER et al. an, daß diese Glycoproteine die Membran durchziehen. Über BRETSCHER (1971), SEGREST et al.(1972), die die Aminosäuresequenz des Teiles analysierten, der innerhalb der Membran liegt, konnten schließlich TOMITA et al.(1976) die vollständige Aminosäuresequenz und die Haftstellen der Oligosaccharide angeben. FURTHMAYR analysierte 1975 PAS-3. Eine spezielle Funktion wie die MN-Blutgruppenantigenität bei PAS-1 und -2 konnte bei PAS-3 nicht sicher gefunden werden. Nach HAKOMORI et al.(1968) und FUJITA et al.(1975) könnten spezielle Blutgruppenantigene auf dem PAS-3-Protein sitzen, doch wurden hierfür auch Glykolipide diskutiert.

Die PAS-4-Bande zeigt sich nur nach Auftragen von größeren Proteinmengen. Dies stellten schon FAIRBANKS et al.(1971) fest. Ihre weiteren Untersuchungen wurden dadurch beeinträchtigt. Neuerdings konnten die Sialoglykoproteine durch Desoxycholat in ihre Monomere aufgespalten werden (FURTHMAYR 1978, LILJAS 1978). Dabei zeigte sich, daß die PAS-1 und 2-Banden aus einer Gruppe von Sialoglykoproteinen bestehen, die Glykophorin A, B und C genannt werden. Dies läßt sich aber mit der SDS-Gelelektrophorese nicht zeigen. BÖHMER et al.(1979) wiesen nach, daß Sialoglykoproteine lysosomale Proteine aktivieren können. Man kann annehmen, daß noch nicht alle Funktionen der Sialoglykoproteine bekannt sind.

Bei diesem Überblick über den heutigen Informationsstand der Membranproteine der Erythrozyten fällt auf, daß eine Änderung eines jeden Proteins Auswirkungen auf die Zellform und Stabilität haben könnte.

4.2 Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

STRÜBING beschrieb 1882 diese einzige, auf einem erworbenen Membrandefekt beruhende Erkrankung des myeloproliferativen Formenkreises zum erstenmal. Die erste ausführliche klinische Beschreibung der seltenen Erkrankung stammt von MARCHIAFAVA (1928). Es gab immer wieder zusammenfassende Betrachtungen, so von CROSBY (1951) und BALLAS (1978).

Die Erkrankung zeigt eine Reihe von Besonderheiten. Wie schon aus dem Namen hervorgeht, kommt es besonders während der Nacht anfallsweise zur Hämolyse und damit zur Hämoglobinurie. Obwohl sie überdurchschnittlich oft mit anderen Enzymdefekten gekoppelt ist, wie dem Pyruvatkinase- oder dem Glutathionreduktase-Defekt, konnte kein Zusammenhang mit diesen Enzymdefekten und auch keine Erblichkeit entdeckt werden. 1953 wies CROSBY daraufhin, daß neben den Erythrozyten auch die Leukozyten betroffen sind, und sich die Störung hier durch Infektanfälligkeit bemerkbar macht. Besonders gefährlich ist die Veränderung der Thrombozyten. Sie kann zu Schmerzattacken und Thrombosen im Pfortaderbereich und Gehirn führen. EHRLICHMANN (1978) zeigte auf, daß eben diese Thrombosen die häufigste Todesursache der PNH-Patienten sind. Das Betroffensein aller drei Zellreihen des Blutes weist auf den erworbenen Stammzellcharakter der Erkrankung hin. Das Ziel der Forschung war natürlich, die Ursache dieser Symptome zu finden. Hier taten sich besonders CROSBY (1953 a,b) und CROSBY und BENJAMIN (1958, 1960) hervor. Mit Mischversuchen von PNH-Erythrozyten in normalem Plasma und umgekehrt von normalen Erythrozyten in Plasma von PNH-Patienten zeigte er, daß die Hämolyse durch eine Störung der PNH-Erythrozyten bedingt ist. Hämolyse trat nur bei PNH-Erythrozyten im Plasma von gesunden Menschen auf. Die Versuche wurden 1958 von KLEMM nachvollzogen. Für die Hämolyse schienen folgende Eigenschaften des Blutplasmas von Wichtigkeit:

1. Sein Gehalt an ionisiertem Kalzium und Magnesium, weil Oxalat und Zitrat die Hämolyse hemmen.
2. Eine Aktivierung des Gerinnungssystems mit Thrombinbildung verstärkt die Hämolyse.
3. PILLEMER et al.(1954) zeigten, daß zum Komplement zusätzlich noch Properdin für die Hämolyse benötigt wird.

Die Wichtigkeit des Komplements zeigte sich immer mehr. Je genauer man dieses System kannte, desto differenzierter wurde das Wissen um den genauen Ablauf der Hämolyse der PNH-Erythrozyten. Durch die Forschungen von ROUAULT et al.(1978), PACKMANN et al.(1979), ROSSE (1979) und ROSENFELD et al.(1980) und andere ist schrittweise fast jedes Detail der Hämolyse bekannt geworden. Aber die Ursache, weshalb es überhaupt zur verstärkten Anlagerung der Komplement-Komponente C3 an die Zellmembran kommt, ist weiterhin ungeklärt.

Durch die Untersuchung von YACHNIN et al.(1961), die nach Vorbehandlung der PNH-Erythrozyten mit proteolytischen Enzymen eine schnellere Zerstörung der Zellen durch das Komplement fanden, wurde klar, daß es sich um Oberflächeneigenschaften der Membran handeln muß. ROSSE (1966) fand eine unterschiedliche Sensibilität der PNH-Erythrozyten gegenüber Komplement. Dieser Befund wurde detaillierter untersucht (ROSSE et al. 1973, 1974 und 1979, ZAVAGLI 1978). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß es drei Sorten von Erythrozyten gibt. Dabei entsprechen die PNH-1-Zellen normalen Erythrozyten. Die PNH-2-Zellen werden durch 1/3 bis 1/5 der Komplementmenge zerstört. Bei den PNH-3-Zellen reichen schon 1/15 bis 1/25 der normalen Komplementmenge. Die PNH-3-Zellen können entsprechend mehr C3 anlagern als normale Zellen.

Ein weiterer Versuch, der Ursache dieser seltsamen Erkrankung auf die Spur zu kommen, bestand in Experimenten, in denen die Veränderungen, die bei dieser Krankheit auftreten, nachgeahmt wurden. Schon 1965

zeigte SIRCHIA daß durch Cystein PNH-ähnliche Zellen erzeugt werden können. FALEZZA (1980) konnte Ähnliches durch 2-Mercaptopropionylglycin erreichen. Beide Stoffe wirken auf Strukturen in der Membran, die N-C-C-SH Gruppen enthalten. So wurde angenomen, daß bei PNH-Erythrozyten ein Mangel an freien SH-Gruppen in der Membran besteht. Aber auch eine Änderung des Sialsäuregehalts, wie er durch Neuraminidase-Behandlung erreicht wird, läßt PNH-ähnliche Zellen entstehen. Dies zeigte HAUSE (1978), der daraufhin folgerte, daß die Oberfläche der Erythrozyten bei PNH-Zellen verändert ist.
Ein weiterer Unterschied der PNH-Zellen zu normalen Erythrozyten ist ihr verminderter Acetylcholinesterasegehalt. KUNSTLING et al.(1969) und FALEZZA et al.(1978) konnten nachweisen, daß dies nicht die Ursache, sondern eine Folge der PNH Veränderungen ist. Denn bei Erythrozyten, die zu PNH-ähnlichen Zellen verändert wurden, war kein Acetylcholinesterase-Mangel zu finden. In der Studie von ROSSE et al.(1979) wird von einem unveröffentlichten Versuch von HORNE und ROSSE berichtet, bei dem in der Gel-Elektrophorese keine Veränderungen des Proteinmusters gefunden wurden. Genauere Informationen über den Versuchsablauf konnten nicht in Erfahrung gebracht werden.

4.3 Nabelschnurblut Neugeborener

Hier werden hauptsächlich die Unterschiede zu Erythrozyten von Erwachsenen aufgezeigt, die für die verstärkte Hämolyseanfälligkeit entscheidend sein können (BROWN 1967). Wie SMITH (1972) gezeigt hat, ist in der ersten Woche die Hb-Abnahme minimal. Die folgende Hämoglobinabnahme auf 11 bis 12 mg/dl Blut in den ersten 3 Monaten beruht wahrscheinlich auf der verminderten Produktion des Knochenmarks. Diese wiederum ist nach SCHULMANN et al.(1954) und SEELMANN (1954) auf die Zunahme des Sauer-

stoffs im Blut mit rückläufiger Erythropoietin-Stimulation des Knochenmarks zurückzuführen. Die physiologische Anämie des gesunden Neugeborenen beruht also nicht auf verstärkter Hämolyse (GAIRDNER et al. 1952). Trotzdem wurde eine Vielfalt von Unterschieden zwischen Nabelschnurerythrozyten und Erythrozyten von Erwachsenen gefunden. TRAVIS et al.(1981) und ORSKI et al.(1975) zeigten, daß es sich dabei meist um einen quantitativen Unterschied handelt. Diese Veränderungen könnten zwar nach ZIPURSKI (1965) eine verstärkte Hämolyse bewirken, doch würde sich dies nicht in der Gel-Elektrophorese der Membranproteine bemerkbar machen, da die veränderten Proteine nicht in der Membran liegen. Das gleiche gilt auch für die Membranlipide. Nach NEERHOUT (1968) zeigte sich nur eine leichte Erhöhung von Lipid, Phospholipid und Cholesterin in der Membran. Eine Veränderung, die am ehesten durch die Membranproteine bewirkt sein könnte, ist die erhöhte Brüchigkeit der Membran. Die mechanische Brüchigkeit ist nach Versuchen von GOLDBLOOM et al.(1953) und HSIA et al.(1954) höher als bei Erythrozyten von Erwachsenen. Hingegen ist die osmotische Resistenz bei Erwachsenen geringer (SJÖLIN 1954). Die mechanische Brüchigkeit der Erythrozyten sollte sich in einer Verringerung ihrer Lebenszeit bemerkbar machen. Dies wird auch durch mehrere Untersuchungen bestätigt. So zeigte HOLLINGWORTH (1955), daß Nabelschnur-Erythrozyten beim Übertragen von Neugeborenen-Blut aus der Umbilikalvene auf normale Erwachsene nach radioaktiver Markierung mit Na-Chromat eine verkürzte Überlebenszeit hatten. Nach ZOCONI et al.(1959) war besonders die Halbwertzeit von Erythrozyten von Frühgeborenen auf 15,8 Tage verringert, wärend die Halbwertzeit der Erythrozyten von reifen Neugeborenen nur auf 22,8 Tage verringert war. Allerdings fanden KAPLAN et al. (1961) nur eine Änderung der Überlebenszeit von Erythrozyten bei Frühgeborenen.
Ein Teil dieser Unterschiede ließ sich durch geänderte Membranproteine erklären. Aber die Untersuchung von

SHAPIRO et.al (1978) zeigte keine qualitativen oder bemerkenswerten quantitativen Unterschiede im Muster der Proteine und Sialoglycoproteine von Erythrozytenmembranen Früh- und Reifgeborener im Verhältnis zu Erythrozytenmembranen Erwachsener. Die in ihrer Studie benutzte Methode ist prinzipiell die gleiche wie die hier vorgetragene. In Einzelheiten weicht diese Studie ab, so bei den benutzten Puffern und den eingehaltenen Zeiten. Diese Unterschiede könnten auf das Ergebnis Einfluß haben.

4.4 Blut chronisch niereninsuffizienter Patienten vor der ersten Dialyse

Wie schon BRIGHT (1836) beschrieb, gehört die Anämie als obligates Zeichen zur chronischen Niereninsuffizienz. Und SCARLETT (1929) beschrieb vier Fälle schwerer chronischer Glomerulonephritis mit Urämie, bei denen Anämie das einzige Hauptsymptom war. Schon 1930 vermutete BECHER daß diese Anämie durch eine Reihe von Ursachen bedingt ist. So stellte er bei leichteren Anämien eine Hydrämie und eine Beeinträchtigung der Erythropoese fest. Bei ausgeprägter Anämie durch Niereninsuffizienz trat die Hemmung der Erythropoese immer stärker in den Vordergrund. Dies war seiner Meinung nach durch Darmfäulnisprodukte bedingt, die sich durch Retention im Blut anhäuften. PARSON (1933) konnte diese Vermutung bestätigen.
Da nach DESFORGES (1958) die Anämie im Verlaufe der Erkrankung ein immer entscheidenderer Faktor wird, der das Befinden des Patienten besonders beeinträchtigt, wurde versucht, Korrelationen von Anämie und Niereninsuffizienz zu finden. SHAW al.(1967) und KELLER (1968) fanden keine Korrelation. Trotzdem ist auch heute noch nach ERSLEV (1972) die Anämie ein charakteristisches Symptom der Niereninsuffizienz.

Beim akuten Nierenversagen kann sich schnell eine Anämie entwickeln. Experimentell erreichten dies MUIRHEAD et al.(1952) durch bilaterale Nephrektomie bei Hunden. Hier war die Anämie hauptsächlich durch Hämolyse bedingt. Auch in diese Hunde transfundiertes Blut wurde hämolysiert. Ähnliche Ergebnisse erzielte man bei nephrektomierten Kaninchen. Daß die Hämolyse aber nur bei einigen Urämikern eine markante Ursache der Anämie ist, zeigte EMERSON (1949) durch Transfusion von markierten Erythrozyten. Hämolyse spielt demnach nur einen verstärkenden Faktor in der Anämie bei Urämikern.

Erythrozyten-Überlebenszeit-Untersuchungen nach Transfusionen wurden von LOGE et al.(1950), SUTHERLAND et al.(1955), REES et al.(1957) und GIOVANNETTI et al.(1965) durchgeführt. Die verkürzte Überlebenszeit der Erythrozyten bei chronisch niereninsuffizienten Patienten konnte normalisiert werden, wenn die Erythrozyten auf kompatible normale Personen übertragen wurden oder eine Dialyse durchgeführt wurde. Normale Erythrozyten, die auf Urämiker übertragen wurden, hatten eine verkürzte Überlebenszeit. STEWART (1967) stellte fest, daß bei akutem Nierenversagen bei allen Patienten die Erythrozyten-Lebensspanne stark verkürzt ist. Hingegen war bei chronischem Nierenversagen unter Hämolyse die Erythrozyten-Lebensspanne praktisch nur bei terminalen Patienten deutlich verkürzt. Blut von diesen Patienten zeigte auch nach Transfusion auf gesunde Probanden keine vollständige Normalisierung der Lebensspanne, was für einen irreversiblen Schaden spricht, den die Erythrozyten erlitten hatten. Die Hämolyserate stieg sprunghaft an, sobald sich die urämische Situation verschlechterte.

Einen weiteren Fortschritt in der Ursachensuche der Anämie bei Niereninsuffizienz machte NAETS (1958). Bei nephrektomierten Hunden zeigte sich eine viel stärkere Anämie als bei Hunden mit Ureterligatur. REISSMANN (1960) fand dafür die Begründung, als er niereninsuffi-

zienten Ratten Erythropoietin spritzte und eine verstärkte Erythropoese beobachtete. LAURENT (1974) zeigte in einer Statistik, daß beidseits nephrektomierte Patienten zweimal so viele Transfusionen benötigen wie entsprechend niereninsuffiziente Patienten, die noch zumindest eine Niere besitzen.

ADAMSON et al.(1968) konnten den Zusammenhang von Erythropoietinmangel, der besonders bei chronischen Nierenerkrankungen durch die langsame Zerstörung des Nierenparenchyms auftritt und der Anämie bestätigen.

Die Erythropoese kann zusätzlich durch Urämietoxine unterdrückt sein. MUIRHEAD et al.(1952) zeigten in Tierversuchen und ESCHBACH et al.(1967) beobachteten bei Menschen eine deutliche Symptombesserung durch Dialyse. SCHULZ (1972) jedoch fand bei Dialyse einen unveränderten Erythropoietinspiegel, so daß die Besserung der Anämie anders begründet werden muß als durch Erhöhung des Erythropoietinspiegels.

Eine Reihe von Arbeitsgruppen widmete sich der Suche nach dem Faktor, der die Erythropoese direkt hemmt. SACCETTI (1953) und MARKSON et al.(1965) zeigten, daß urämisches Plasma in vitro die Erythroblastenreifung und Proliferation hemmt. HENKINS et al.(1964) bestätigten diesen toxischen Effekt. Auch das Wachstum von HeLa-Zell-Kulturen wurde durch Dialyseflüssigkeit von Nierenpatienten gehemmt. Ebenso bildet sich Granulationsgewebe langsamer aus als bei gesunden Menschen (NATHAN et al.1971). MONSEL et al.(1979) untersuchten den Einfluß der Urämie auf die weißen Blutkörperchen und fanden eine Reihe Veränderungen wie z.B. eine verkürzte Überlebenszeit. SHAW (1967) vermutete daß dieser toxische Stoff aus dem Eiweißstoffwechsel stammen muß, da bei chronisch niereninsuffizienten Patienten, die mit einer proteinarmen Diät ernährt wurden, die Erythrozyten-Überlebenszeit normal blieb. Zusätzliche Faktoren, die auch zur Anämie führen bzw. beitragen, sind die von LEWIS et al.(1956) und HALKEN et al.(1971) unter-

suchte Blutungsneigung bei Urämikern. MÜLLER-WIEFEL (1980) untersuchte besonders gastrointestinale Blutungen, die zu einem Teil iatrogen bedingt waren. Durch die Dialyse geht nach LASKER et al.(1963) und LICHTMAN et al.(1970) vermehrt Folsäure verloren, was auch zur Anämie führen kann.

Eine besondere Veränderung im roten Blutbild stellen die sogenannten relativ spezifischen Burr-Zellen dar (SCHWARZ et al.1949). Die Erythrozytenmembran zeigt dabei eine Reihe von Ausziehungen. Die Anomalie kommt fast nur bei Urämie, Magencarcinom und blutendem, peptischem Ulcus vor. Nach AHERNE (1957) stellen diese Zellen wahrscheinlich überstürzt aus dem Knochenmark ausgestoßene Erythrozyten dar.

Besonderes Augenmerk wurde auf die Schädigung der Erythropoese und die Hämolyse gelegt, da beide eventuell durch eine Membranproteinveränderung bewirkt sein könnten.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Von E.Merck AG, Darmstadt, wurden benutzt: Tris (Hydroxymethylaminomethan) Best. Nr.8382, 1N HCl Nr.9057, TEMED (Tetramethyläthylendiamin) Nr.808742, Äthanol Nr.972, Bromphenolblau Nr.8122, Na-Acetat Nr.6265, 96% konz. Essigsäure Nr.62, Na2-EDTA Nr.8418, SDS Dodecylhydrogensulfat Na-Salz Nr.822050, Isopropanol Nr.9634, Perjodsäure Nr.524, 2-Mercaptoäthanol Nr.805740, Schiffs Reagenz Nr.9034.

Von Serva, Heidelberg, kamen: Acrylamid Nr.10675, Methylenbisacrylamid Nr.29195, Ammoniumpersulfat Nr.13375, Saccarose Nr.35579. Von Schuchhardt München GmbH, München kam Na_4-EDTA (AE 172).

Rinder-Serum-Albumin wurde von der Behringwerke AG, Frankfurt, unter der Nr.225046 A und die Gradienten-Gele PAA 4/30 von der Firma Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg, unter der Best. Nr.GC 19359 bezogen. Die Reagenzien zur Proteinbestimmung nach LOWRY wurden in der Apotheke der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf aus Chemikalien der Firma E.Merck, Darmstadt, hergestellt. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, lieferte den Färbesatz für fetales Hämoglobin unter der Best. Nr.124249.

5.2 Präparation der Erythrozyten-Membranen

Die Präparation von Erythrozyten-Ghosts wurde ähnlich der Methode von STECK et al. (1970) durchgeführt, die wiederum dem Prinzip von DODGE et al. folgte. Zitratblut wurde durch Zentrifugieren bei 3000 U/min mit der Laborfuge 3 HC 160 der Firma Heraeus-Christ GmbH, Osterode am Harz, in gepackte Erythrozyten und Plasma getrennt. Zwischen beiden Fraktionen liegt eine weiße Schicht, der sog."Buffycoat", der zusammen mit dem Plasma abgesaugt wurde. Die gepackten Erythrozyten wurden dann

in kalter, gepufferter 0,9% NaCl-Lösung aufgeschwemmt und erneut zentrifugiert, wie oben beschrieben. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt.
Von den derart gereinigten, gepackten Erythrozyten wurden jeweils 1-2 g in ein Röhrchen gefüllt und mit 10 mM Tris-HCl-Puffer PH 7,4 auf 36 g aufgefüllt. Die zytolysierten Erythrozyten wurden 20 min mit 20000 U/min bei 4° C in der Sorvall-Zentrifuge RC-5B mit dem Rotor SS 34 (Du Pont Deutschland GmbH, Bad-Nauheim) zentrifugiert. Der durch das freigesetzte Hämoglobin rotgefärbte Überstand wurde abgesaugt und der am Boden des Röhrchens festsitzende Leukozytenknopf verworfen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die gepackten "Ghosts" kremig-opaque aussahen. Die Erythrozyten-Ghosts konnten eingefroren bei -20C aufbewahrt werden.

5.3 Proteinbestimmung nach LOWRY

Um bei der Gelelektrophorese gleiche Proteinmengen auftragen zu können, wurde eine Proteinbestimmung der Erythrozyten-Ghosts nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt.

5.4 Gel-Herstellung

Die Polyacrylamid-Gradienten-Gele PAA 4/30 wurden von der Deutschen Pharmacia GmbH, Freiburg (Best. NR.GC 19359) bezogen. Die 7,5% homogenen Gele wurden selbst hergestellt. Prinzipiell folgte man dabei der Vorschrift von DAVIS (1964). Es mußten die folgenden Lösungen hergestellt werden:
Lösung A bestand aus 48,0 ml einer 1 M HCl-Lösung mit 36,6 g Tris und mit 0,46 ml TEMED, mit Aqua dest. ad 100 ml aufgefüllt. Lösung B bestand aus 30 g Acrylamid und 0,8 g Methylenbisacrylamid ad 100 ml Aqua dest. und mußte nachträglich gefiltert werden.
Die Lösung C aus 0.14 g Ammoniumpersulfat ad 100 ml

Aqua dest. mußte jeweils frisch angesetzt werden.
Um den Start der Polymerisation zu verzögern, wurden alle Lösungen vor dem gründlichen Mischen im Kühlschrank auf 4° C gekühlt. Für die 7,5% Gele mußten 1 Teil von Lösung A, 2 Teile von B, 1 Teil Aqua dest. und zum Schluß 4 Teile von Lösung C zusammengegeben werden. Gut gemischt wurde diese Lösung möglichst bald in den "Gel Slab Casting Apparatus GSC-8" von Pharmacia FC geleitet. Damit keine Luftblasen auftraten, war schon vorher ein gekühltes Tris-Puffer/Äthylen (4/1)-Gemisch eingefüllt worden, das mit einigen Kristallen Bromphenolblau gefärbt war. Die polymerisierten Gele konnten spätestens am nächsten Tag entnommen werden.

5.5 Gel-Elektrophorese

Für die Gel-Elektrophorese wurden folgende Geräte von der Deutschen Pharmacia GmbH, Freiburg, benutzt: der Elektrophorese- Apparatus GE-4 2 mit Power Supply EPS 500/400. Das Kühlgerät stammte von Julabo: Paratherm FT 2. Pro Elektrophorese-Lauf wurden immer nur zwei Gele eingesetzt mit jeweils 6 Auftragestellen. Dadurch konnte die Auftragszeit kurz gehalten werden. Der Spannungsgradient blieb mit 9 V/cm im Einlauf und 15 V/cm im Hauptlauf konstant, ebenso änderte sich die Stromstärke pro Auftragstelle kaum mit ungefähr 5 mA/Auftragstelle beim Einlauf und 10 mA/Auftragstelle beim Hauptlauf. Die Gel-Elektrophorese entspricht mit einer Reihe von Änderungen den Berichten von FAIRBANKS (1969). Die Stammlösung des Puffers wurde aus 96,912 g Tris in 800 ml Aqua dest., 32,812 g Na-Acetat in 200 ml Aqua dest. und 14,889 g Na_2-EDTA in 200 ml Aqua dest. hergestellt. Diese Lösungen wurden zusammengegeben, mit konz. Essigsäure auf einen PH-Wert von 7,4 eingestellt und anschließend mit Aqua dest. auf 2000 ml aufgefüllt.
Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung mit Aqua

dest. auf 1/10 verdünnt und mit 2 g SDS/1000 ml versetzt. Zur Gel-Elektrophorese mußten die Erythrozyten-Ghosts vollständig aufgelöst werden. Nachdem sie aufgetaut waren und mit Aqua dest. die richtige Protein-Konzentration eingestellt war, wurden die Erythrozyten-Ghosts mit dem SDS-Proben-Puffer versetzt. Der SDS-Probenpuffer besteht aus 10 mM Tris/ HCl PH 8,0 ,in dem 1 mM Na_4-EDTA, 1% SDS, 1% 2-ME(DTE), 10% Saccarose zum konzentrieren und 0,05% Bromphenolblau zum Färben der Probe gelöst werden. Diese Lösung wird mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Das Gemisch von Erythrozyten-Ghosts und SDS-Probenpuffer wurde dann in einem auf 60° C vorgeheizten Wasserbad 30 min inkubiert. Durch leichtes Bewegen der Röhrchen wurde ein gleichmäßiges Temperieren des Inhalts bewirkt. Die hohe SDS-Konzentration bewirkte eine vollständige Auflösung der Erythrozyten-Membran. So bearbeitet konnten die Membran-Extrakte auf die Gele aufgetragen werden.

Die Gele wurden durch eine einstündige Vorelektrophorese bei 125 V mit dem Elektrophorese-Puffer äquilibriert. Aufgetragen wurden 20-40 µg Eiweiß in 10 µl Auftragsmenge pro Auftragstelle. Für den 20-minütigen Probenauftrag bei 70 V wurde die Umwälzung des Elektrophorese-Puffers gestoppt. Danach wurde die Spannung auf 125 V erhöht. In homogenen 7,5%-Gelen benötigten die Membranproteine für die gesamte elektrophoretische Auftrennung 2,5-3 h. Die Gradienten-Gel-Elektrophorese lief hingegen 12-15 h, um scharfe Banden zu erhalten. Zur Markierung wurde nach Beendigung der Gel-Elektrophorese in die linke obere Ecke eines jeden Gels mit einer in schwarze Tinte eingetauchten Nadel eingestochen.

5.6 Querelektrophorese

Da SDS die Färbungen stört, wurde es durch eine Querelektrophorese im Gerät der Deutschen Pharmacia GmbH, Freiburg: Destainer GD-4 2 und Power Supply DPS, ent-

fernt. Die Querelektrophorese wurde in einer Lösung aus 10% Essigsäure, 25% Isopropanol und Aqua dest. bei 24 V, 2 x 15 min, durchgeführt. Die Essigsäure wirkte gleichzeitig fixierend.

5.7 Coomassie-BB Färbung

Die normale Proteinfärbung mit Coomassie Blue wurde mit einer leichten Abwandlung nach G. FAIRBANKS (1971) durchgeführt. Die Gele wurden über Nacht oder auch länger in einer Lösung aus 10% Essigsäure, 25% Isopropanol, 0,23 g/200 ml Coomassie BB und Aqua dest. gefärbt. Das Herauslösen des überflüssigen Coomassie BB wurde unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer mit einer Lösung aus 10% Essigsäure, 25% Isopropanol und Aqua dest. erreicht. Diese Lösung mußte mehrmals gewechselt werden, bis nur noch die Proteinbanden eine Blaufärbung zeigten.

5.8 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung machte die größten Schwierigkeiten. Die herkömmliche PAS-Färbung konnte nicht überzeugen (s.a.GLOSSMANN 1971). Die PAS-Färbung nach FAIRBANKS (1971) war unbefriedigend, weil besonders bei den Gradienten-Gelen in den unteren, dichteren Bereichen immer wieder eine relativ starke Hintergrund-Absorption bestehen blieb. Sie machte eine photographische Dokumentation der Banden unmöglich. Dies Phänomen wurde auch schon von FAIRBANKS beschrieben. Mit anderen Methoden konnte nicht immer eine Anfärbung der Banden erreicht werden. Z.B. die Färbemethode von KÖIW (1952) und die daraus entwickelte Methode von KEYSER (1964) zeigten sehr wechselnde Ergebnisse. Schließlich führte eine Färbung, die in einer Informationsschrift von Pharmacia angegeben wird, zu einem zufriedenstellenden Ergebnis.
Zuerst wurden die Gele 1 h bei Raumtemperatur auf dem

Magnetrührer mit 7,5% Essigsäure weiter fixiert, anschließend 45 min bei 4° C in 0,2% Perjodsäure aufbewahrt. Danach wurde das Gel sofort, ohne Abspülen der Perjodsäure, 45 min bei 4° C in Schiffs Reagenz gefärbt. Da die Gele nie überfärbt waren, brauchten sie auch nicht entfärbt zu werden. Die so gefärbten Gele konnten über mehrere Tage in 10% Essigsäure bei 4° C gelagert werden. Ein Nachfärben war möglich. Die gefärbten Gele wurden im Durchlichtverfahren photographiert. Zur Dokumentation wurde der Film Agfa Ortho Professional 25 der Firma Agfa verwendet.

5.9 Hb-F Färbung

Mit einer Färbemethode, die durch Säureelution adultes Hämoglobin von fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten unterscheidet, wurde das Nabelschnurblut auf seinen Hb-F Gehalt untersucht. Es zeigte sich, daß zwischen 30 und 50% der Nabelschnur-Erythrozyten Hb-F enthielten.

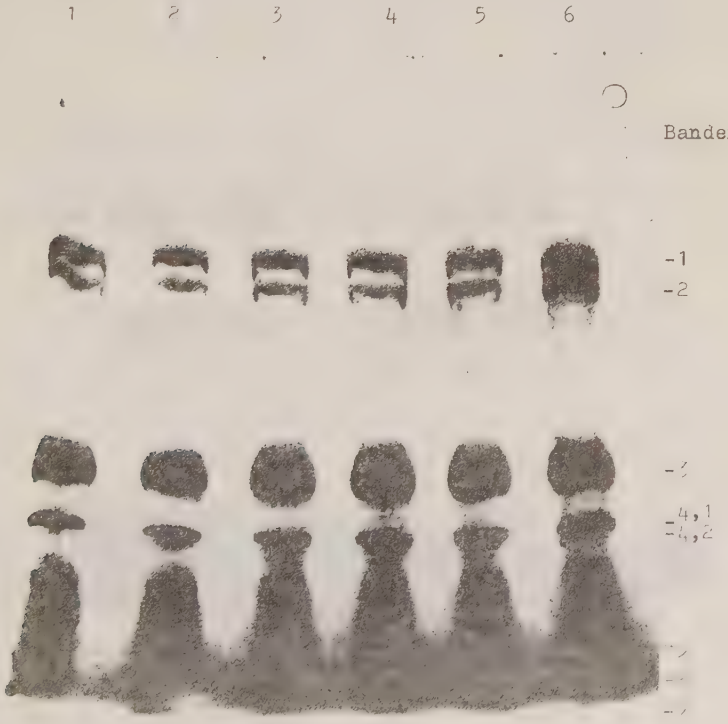
6.Ergebnisse

Wie bei FAIRBANKS et al.(1971) konnten alle Proteinbanden mit Coomassie-BB (siehe Bilder 1,3,5,7) und die Sialoglykoproteinbanden mit PAS (siehe Bilder 2,4,6,8) gefärbt dargestellt werden. Es waren keine Unterschiede im Bandenmuster der Erythrozytenmembranen von gesunden Erwachsenen, Neugeborenen, oder Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, oder PNH festzustellen, weder eine Verschiebung oder Abschwächung, noch die Aufspaltung einer Bande. Da mit den kontinuierlichen Gelen (siehe Bilder 3,4,7,8) das Verhältnis von Molekulargewicht zu Ladung und mit den Gradienten-Gelen (siehe Bilder 1,2,5,6) nur das Molekulargewicht verglichen wurde und sich keine Änderung zeigte, haben sich demnach weder das Molekulargewicht noch die Gesamtladung verändert. Eine Änderung der Proteine oder Zuckerreste, die keine Auswirkung auf das Proteinmuster bei der Gel-Elektrophorese hat, ist nur eine theoretische Möglichkeit. Das wäre z.B. ein Austausch von Aminosäuren der gleichen Ladungsgruppe oder ein Austausch nicht ionisierter Aminosäuren. Dies hat meistens auch keine Auswirkung auf die Funktion des Proteins. Ebenso unwahrscheinlich wäre ein Austausch von Zuckerresten, ohne daß sich die Ladung und damit die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins ändert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist also nachgewiesen, daß kein Unterschied besteht zwischen den Proteinen der Erythrozytenmembran von gesunden Erwachsenen und den Membranproteinen von Neugeborenen, von Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

1)
Gradienten-Gel PAA 4/30, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 11 h 35 min
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 2,5 mg/ml
Proteinmenge 25 µg, Coomassie-BB Färbung

Auftrag 1 und 4: Ery-Extrakte von normalen Erwachsenen
Auftrag 2 und 5: Ery-Extr. chronisch-urämischer Patienten
Auftrag 3 und 6: Ery-Extr. Neugeborener

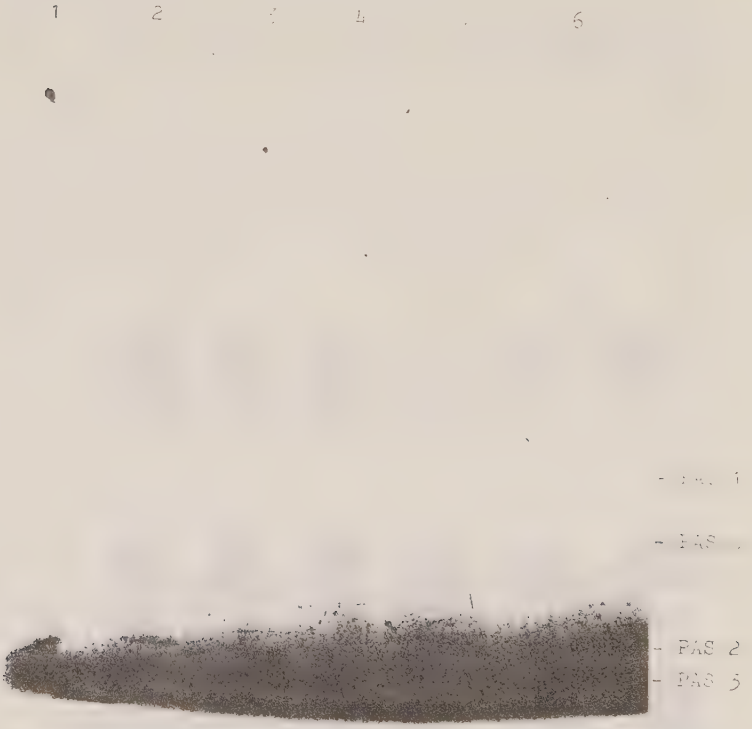
Die Bande 7 ist im Auftrag 1, 2 und 6 unten aus dem Gel herausgelaufen.



2)

Gradienten-Gel PAA 4/30, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 11 h 35 min
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 2,5 mg/ml
Proteinmenge 25 ug, PAS-Färbung

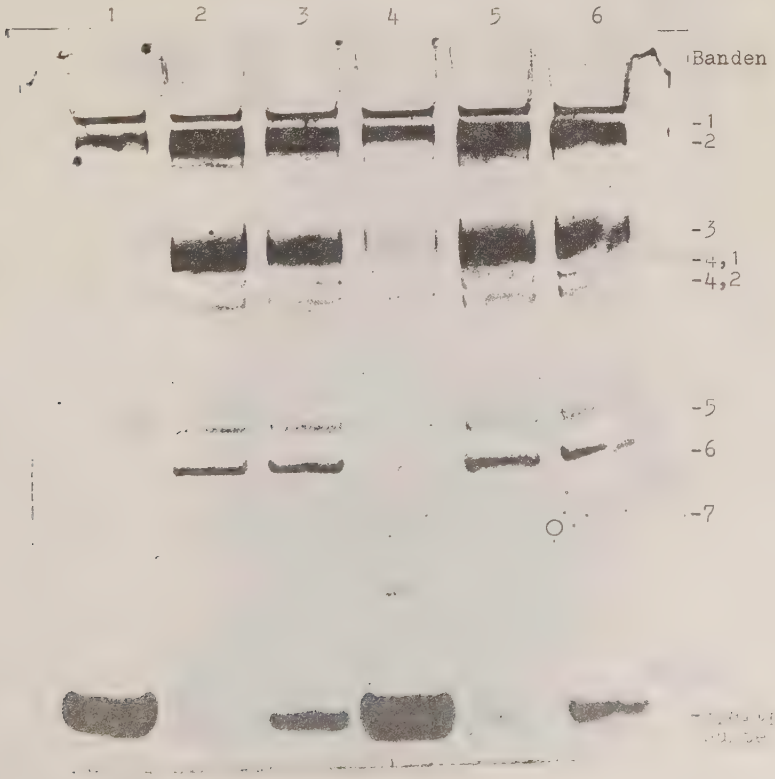
Auftrag 1 und 4: Ery-Extrakt normaler Erwachsener
Auftrag 2 und 5: Ery-Extr. chronisch-urämischer Patienten
Auftrag 3 und 6: Ery-Extr. Neugeborener



3)
Kontinuierliche-Gele 7,5%, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 3 h
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 2 mg/ml
Proteinmenge 20 ug, Coomassie-BB Färbung

Auftrag 1 und 4: Ery-Extrakte normaler Erwachsener
Auftrag 2 und 5: Ery-Extr. chronisch-urämischer Patienten
Auftrag 3 und 6: Ery-Extr. Neugeborener

Obwohl die Ery-Membran-Extrakte in Auftrag 1 und 4 die gleichen sind wie in Bild 1, scheint hier ein Teil der Proteine zerfallen zu sein, da sich die Banden schwächer anfärben und sich Spaltprodukte in zwei Banden am unteren Gel-Rand angesammelt haben.

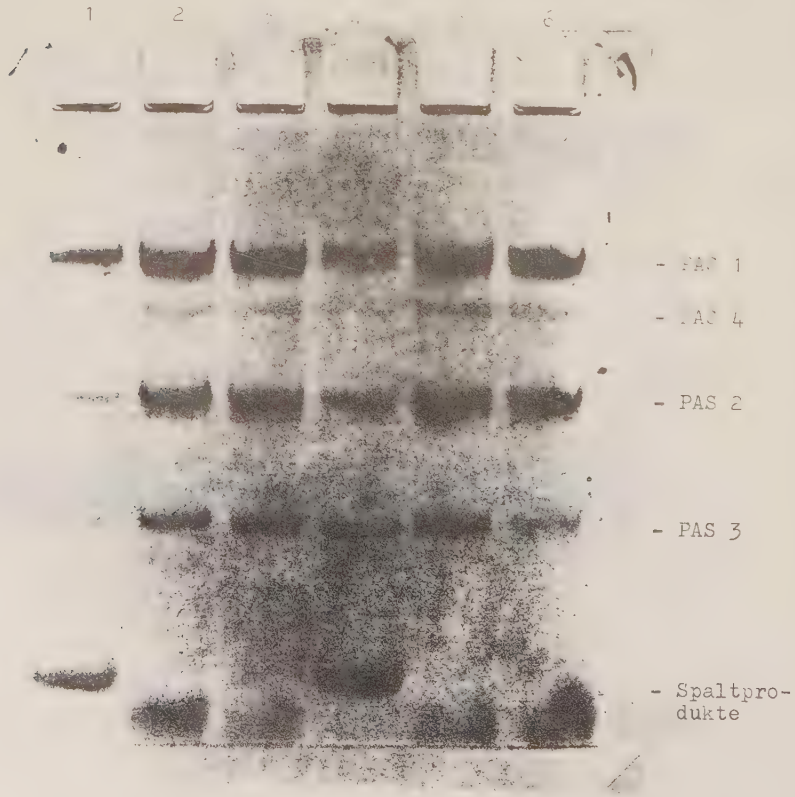


4)

Kontinuierliche-Gele 7,5%, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 3 h
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 4 mg/ml
Proteinmenge 40 µg, PAS-Färbung

Auftrag 1 und 4: Ery-Extrakte normaler Erwachsener
Auftrag 2 und 5: Ery-Extr. chronisch-urämischer Patienten
Auftrag 3 und 6: Ery-Extr. Neugeborener

Obwohl die Erythrozyten-Membran-Extrakte in Auftrag 1 und 4 die gleichen wie in Bild 2 sind, scheint hier ein Teil der Proteine zerfallen zu sein, da sich die Banden schwächer anfärben und sich Spaltprodukte in Banden am unteren Gel-Rand angesammelt haben.

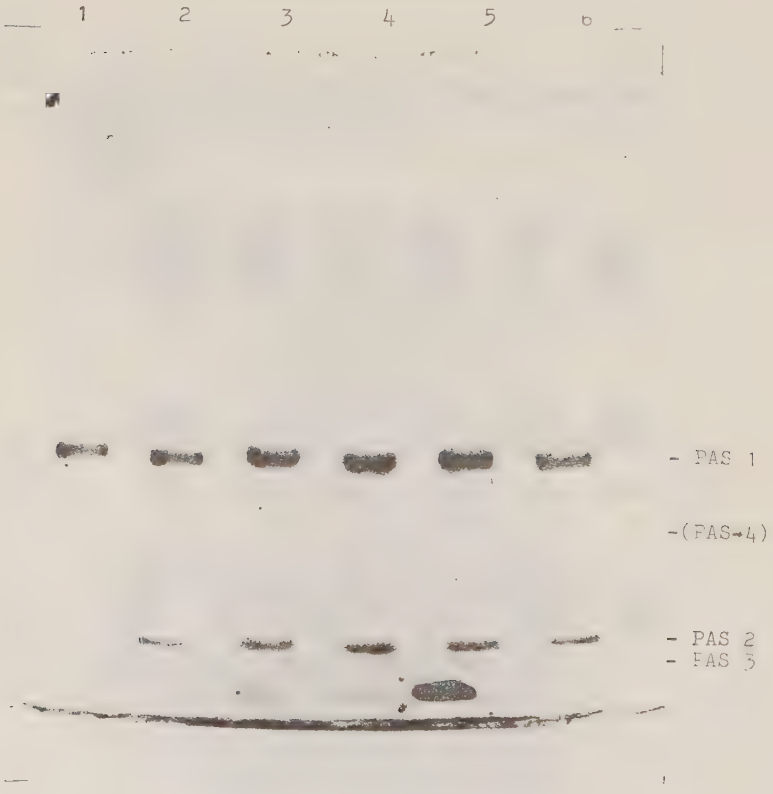


5)
Gradienten-Gel PAA 4/30, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 11 h
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 2 mg/ml
Proteinmenge 20 µg, Coomassie-BB Färbung

Auftrag 1, 3 und 5: Ery-Extrakte normaler Erwachsener
Auftrag 2, 4 und 6: Ery-Extr. einer Patientin mit PNH

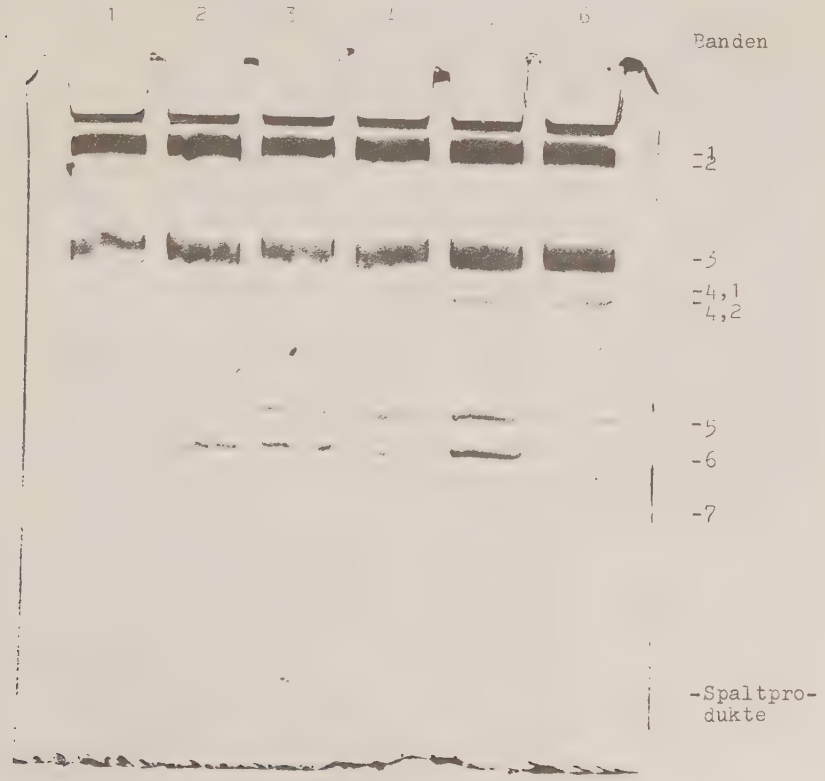
6)
Gradienten-Gel PAA 4/30, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 11 h
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 2 mg/ml
Proteinmenge 20 µg, PAS-Färbung

Auftrag 1, 3 und 5: Ery-Extrakte normaler Erwachsener
Auftrag 2, 4 und 6: Ery-Extr. einer Patientin mit PNH



7)
Kontinuierliche-Gele 7,5%, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 2 h 30 min
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 2 mg/ml
Proteinmenge 20 µg, Coomassie-BB Färbung

Auftrag 1 und 4: Ery-Extrakte normaler Erwachsener
Auftrag 2 und 5: Ery-Extr. einer Patientin mit PNH, die mit der Patientin aus Bild 5 identisch ist.
Auftrag 3 und 6: Ery-Extr. einer Patientin mit PNH
Die Bande am unteren Gelrand zeigt Spaltprodukte der Membranproteine.



8)
Kontinuierliche-Gele 7,5%, SDS Puffer pH 7,4
Gesamtdauer der Elektrophorese 2 h 30 min
Auftragsmenge 10 µl, Proteinkonzentration 2 mg/ml
Proteinmenge 20 µg, PAS-Färbung

Auftrag 1 und 4: Ery-Extrakte normaler Erwachsener
Auftrag 2 und 5: Ery-Extr. einer Patientin mit PNH,
sie ist mit der Patientin aus Bild 6 identisch.
Auftrag 3 und 6: Ery-Extr. einer Patientin mit PNH

- PAS 1

- PAS 4

- PAS 2

- PAS 3

7. Diskussion

Aus der Einleitung kann man entnehmen, daß fast alle Membranproteine des Erythrozyten direkt oder indirekt mit der Membranstabilität zu tun haben. Spektrine 1,2 und das Protein Bande-5 bilden zusammen mit dem Protein der Bande-4,1 als Fixpunkt das Zytoskelett. Es gibt eine große Anzahl von Untersuchungen, die zeigen, daß Schäden dieses Zytoskeletts sich in einer Membrandeformität äußern. Die hereditäre Sphärozytose ist ein entsprechendes Experiment der Natur. Neuere Untersuchungen zeigen ein Fehlen der Bande-4,2 bei einem Teil der Patienten (AMSDEN et al. 1972 und FEIG et al. 1974). Bande-6 wurde als Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und damit als Enzym des Pentosephosphatzyklus erkannt. Eine Änderung beeinflußt über den Energiehaushalt die Erythrozytenstabilität, wie man es häufig an der Medikamentenunverträglichkeit bei Patienten mit einem angeborenen G-3-P-D-Mangel feststellt. Durch die Medikamente kommt es zur Oxidierung des Gluthations, da zu wenig NADPH zur Verfügung steht (WELLHÖNER 1976, FORTH 1977). Die S-H-Gruppen der Membran sind damit ungeschützt, was schließlich zur Hämolyse führt. Der letzte Schritt wird auch bei PNH diskutiert. Bande-3 hat als Transportweg für Anionen, für Zucker und damit auch für Wasser direkt mit dem Zellvolumen und Energiehaushalt zu tun. Veränderungen können sich auf die osmotische Resistenz auswirken. Bei den Sialoglykoproteinen ist wahrscheinlich die Änderung der Zelloberflächen-Ladung entscheidend, die sowohl durch andere Zuckerreste als auch durch eine Abwandlung der darunter liegenden Aminosäure-Sequenz erreicht wird. Durch Änderungen an den Sialoglykoproteinen können sich die Ladung der Erythrozyten und die Antigenität ändern. Nach ROSSE (1973) kann dies bei den PNH-3 Erythrozyten der Fall sein. Sie lagern, wie beschrieben, sehr viel C3-Komplement an, was durch die oben diskutierte Membranveränderung bewirkt sein

mag. PALEK (1980) und COHEN (1981) zeigen in ihren Arbeiten, welche überragende Bedeutung die Membranproteine für die Membranstabilität haben. Geringste Änderungen im Zytoskelett, das aus den Membranproteinen aufgebaut ist, würden wahrscheinlich zu einer erhöhten Fragilität der Erythrozyten und damit zur Hämolyse führen. EHRLICHMANN (1978) berichtet in seiner Schrift über die PNH, daß der Defekt in den Erythrozyten selbst liegt, daß aber die wahre Natur des Defektes noch völlig unbekannt ist. Man kann sich auch vorstellen, daß sich nicht bei allen Trägern dieser Erkrankung Änderungen nachweisen lassen oder daß PNH ähnlich wie andere hämolytische Anämien keine einheitliche Krankheitsursache hat. So fand z.B. FEO (1980) nur bei einem von 4 Fällen von angeborener Elliptozytose mit der Gel-Elektrophorese ein Fehlen der Bande-4,1. Die drei anderen zeigten ein normales Proteinmuster. Auch SHOHET (1982) vermutet, daß die Sphärozytose nur der klinische Ausdruck ganz unterschiedlicher biochemischer Veränderungen ist. Es bestehen zwar noch eine Reihe von Unklarheiten bei der PNH wie z.B. ihr Zusammenhang mit anderen myeloproliferativen Erkrankungen und die eigentliche Ursache der Veränderung. HORNE und ROSSE (1979) stellten mit ihrer Methode keine Änderung des Membranprotein-Musters fest. Mit der hier benutzten Methode konnte ich dieses Ergebnis bestätigen.

Bei Nabelschnur-Erythrozyten hat man so viele Unterschiede zu adulten Erythrozyten gefunden, sowohl bezüglich des Stoffwechsels als auch der Membranfunktionen, daß man Defekte in den Membranproteinen vermuten könnte. Gerade die Forschung über erhöhte mechanische Brüchigkeit der Membran läßt hier Veränderungen annehmen. Doch die kürzlich erschienene Studie von SHAPIRO (1978) bestätigt die von mir erhaltenen Ergebnisse. Es zeigten sich keine Unterschiede im Muster der Proteine. Da SHAPIRO auch Blut von Frühgeborenen untersucht hat und ebenfalls keinen Unterschied feststellte, muß man

annehmen, daß zumindest fetales Blut, das im Knochenmark produziert wird, das gleiche Proteinmuster aufweist, wie es in Erythrozytenmembranen Erwachsener vorliegt. Im Blut urämischer Patienten findet die Schädigung der Erythropoese durch Toxine besonderes Interesse. Änderungen der Zuckerreste der Sialoglykoproteine können durch Hemmung der entsprechenden aufbauenden Enzyme im Knochenmark verursacht sein. Genauso interessant sind in diesem Zusammenhang die Burr-Zellen. Ihre Form kann durch eine Reihe von in der Membran zu suchenden Defekten verursacht sein. Auch die intravasale Hämolyse durch ein Urämietoxin kann durch derartige Veränderungen herbeigeführt sein. Nach STEWART (1967) tritt Hämolyse hauptsächlich bei akutem Nierenversagen und in der terminalen Phase der chronischen Niereninsuffizienz auf. Aufgrund ihrer Seltenheit wurden diese Gruppen in der Auswahl der Patienten nicht erfaßt. Wie die Untersuchungen von ESSLEV (1972) und ADAMSON et al.(1968) zeigen, ist die renale Anämie hauptsächlich durch Erythropoietinmangel bedingt. Dabei ist kaum mit einem Einfluß auf die Membranproteine zu rechnen. Denn es ist unwahrscheinlich, daß auf diesem Wege strukturelle Änderungen auftreten, und nur solche sind mit der Gel-Elektrophorese festzustellen. Aus diesem Grunde ist eine Untersuchung der Erythrozytenmembran urämischer Patienten erforderlich, die unter einer besonders starken intravaskulären Hämolyse leiden. Ebenso interessant könnte eine entsprechende Untersuchung der Burr-Zellen sein. Doch ist die Anreicherung dieser Zellen schwierig, da sie im Blut von Urämikern nur zwischen 0,1 bis 1,5% ausmachen.

Es gab genügend Gründe anzunehmen,daß sich ein Membrandefekt in der Gel-Elektrophorese bemerkbar macht. Viele Untersuchungen gerade mit der SDS-Gel-Elektrophorese bei verschiedensten Erythrozyten-Erkrankungen zeigen Änderungen im Proteinmuster. So weicht z.B. das Proteinmuster des Sichelzellhämoglobins in Position 5 vom

normalen Hb ab. Sogar bei Gallestauung ließ sich eine Verminderung oder ein Fehlen der Bande 4,2 feststellen. Das negative Ergebnis dieser Untersuchungen bestätigen jedoch oben aufgeführte Studien, die mit weniger empfindlichen Methoden ebenfalls keine Veränderungen in der Zusammensetzung der Membranproteine nachweisen konnten.

7.1 Zusammenfassung

Mit der SDS-Gel-Elektrophorese zeigt sich keine Änderung im Muster der erythrozytären Membranproteine bei bestimmten Erkrankungen, die mit Hämolyse einhergehen. Weder qualitativ noch quantitativ waren bei Blutproben von PNH-Patienten, Neugeborenen oder chronisch niereninsuffizienten, nicht dialysierten Patienten Unterschiede zu normalen Kontrollen zu erkennen. Es wird deshalb gefolgert, daß es unter den, mit der Gel-Elektrophorese zu erfassenden Proteinen, keine Unterschiede im Muster der Membranproteine gibt, wenn man von einem eventuellen Austausch ladungs- und massegleicher Aminosäuren absieht.

8. Literaturverzeichnis

Adamson, J.W., J.W. Eschbach, C.A. Finch: The kidney and erythropoiesis. Amer.J.Med. 44: 725 (1968)

Amsden, J.H., T.J. White: Membrane mikrofilaments of Erythrocytes: Alteration in intact cells reproduces the HS-syndrome. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69: 471-74 (1972)

Akerne, W.A.: The "Burr" red cell and azotaemia. J.clin.Path. 10: 252 (1957)

Ballas, S.K.: Disorders of the red cellmembrane: a eclassification of hemolytic anemias. Am.J.Med.Sci. 276(1): 4-22 (1978)

Becher, E.: Vorkommen und Ursachen der Anämie bei Nierenkrankheiten. Münch.Med.Wschr. 77: 1657 (1930)

Bender, W.W., H. Geron,H.C. Berg: Proteins of the human erythrocyte membrane as modified by Pronase. J.Mol.Biol. 58: 783-903 (1971)

Bennet, V., for P.J. Stenbuck: The membrane attachment protein spektrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. Nature 280(5722): 468-73 (1979)

Bennet, V., D. Branton: Selective association of spectrin with the cytoplasmatic surface of human erythrocyte. J.Biol.Chem. 252: 2753-63 (1977)

Berg, H.C.: Sulfanilic Acid Diazonium Salt: A label for the outside of the human erythrocyte membrane Biochim.Biophys.Acta 183: 65-78 (1969)

Beutler, E., D. Villacorte: Spectrin extractability in blood storage Transfusion 21(1): 96-9 (1981)

Bhaki, S., H. Knüfermann, D.F. Wallach: Separation of EDTA-extractable erythrozyte membrane proteins by isoelectric focussing linked to electrophoresis in SDS. Biochim.Biophys.Acta 345: 448-57 (1974)

Bjerrum, O.J., S. Bhaki,B. Hansen, H. Knüfermann: Immunelectrophoretic heterogeneity and cross-reactions of individual "spectrin" components isolated by preparative SDS-polyacrylamide-gel-electrophoresis. Biochim.Biophys.Acta 373: 44-50 (1974)

Böhmer, F.D., H. Kirschke, P. Bohley,R. Schön: Membrane sialoglycoproteins from human erythrocytes activates lysosomal proteinases. Acta Biol.Med.Ger. 38: 1521-6 (1979)

Bretscher, M.S.: Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane. Nature New Biol. 231: 229-32 (1971)

Bretscher, M.S.: Human erythrocyte membranes: Specific labelling of surface proteins. J.Mol.Biol. 58: 775-81 (1971)

Bright, R.: Cases and observations, illustrative of renal disease accompanied with the secretion of abbonsinous urine. Guys Hosp.Rep. 1: 338 (1836)

Brown, A.K.: Erythrocyte metabolism and hemolysis in the newborn. Univers. of Virginia Hosp.:879-903 (1967)

Cabantchik, Z.I., M. Balshin, W.Breuer, A. Rothstein: Pyridoxal Phosphate: An anionic probe for protein amino-groups on the outer and inner surfaces of intact human red blood cells. J.Biol.Chem. 250: 5130-36 (1975)

Cabantchik, Z.I., A. Rothstein: Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. J.Membr.Biol. 15: 207-48 (1974)

Carraway, K.L., B.C. Shin: Specific modification, isolation and partial characterization of an erythrocyte membrane protein. J.Biol.Chem. 247. 2102-8 (1972)

Carraway, K.L., R.B. Triplett, D.R. Anderson: Calcium-promoted aggregation of erythrocyte membrane proteins. Biochim.Biophys.Acta 379: 571-81 (1975)

Cohen, C.M., D. Branton: The normal and abnormal red cell cytoskeletton: a renewed search for molekular defects. Trends in Biochemical Sciences 6: 266-8 (1981)

Crosby, W.H.: PNH: A classic description by Paul Strübing in 1882 and a bibliography to the disease. Blood 6: 270 (1951)

Crosby, W.H.: Die nächtlich paroxysmale Hämoglobinurie in: Handbuch der gesamten Hämatologie Bd. 3, S. 663-672 (1953)

Crosby, W.H.: PNH: Plasma factors of the hemolytic system. Blood 8: 444 (1953 a)

Crosby, W.H.: PNH: Relation of the clinical manifestations to underlying pathogenetic mechanisms Blood 8: 769 (1953 b)

Crosby, W.H., Benjamin: PNH: The role of Properdin in the diagnostic thrombin test. Blood 13: 684 (1958)

Crosby, W.H., Benjamin: PNH: The role of antibodies in the diagnostic thrombin test. Blood 15: 505 (1960)

Davis, B.J.: Disc-electrophoresis: Method and application to human serum proteins. Ann.NY Acad.Sci. 121: 404 (1964)

Desforges, J., J.P. Dawson: The anemia of renal failure. Arch.intern.Med. 101: 326 (1958)

Dodge, T.J., C. Mitchell, D.J. Hanahan: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. Arch.Biochem.Biophys. 100: 117-119 (1963)

Ehrlichman, R.J.: Clinical conferences: PNH. Johns Hopkins Med.J. 142: 218-23 (1978)

Emerson, C.P., J.R. Belton, A. Burrows: The mechanism of anemia and its influence on renal function in chronic uremia. J.clin.Invest. 28: 779 (1949)

Erslev, A.J.: Anemia of chronic renal failure. in: Hematology Hrsg.von W.J. Williams, E.Beutler, A.J.Erslev, R.W.Rundles, Mc Graw-Hill, S.237 New York (1972)

Eschbach, J.W., D. Funk, I. Kuhn, J.W. Adamson, B.H. Scriber, C.A.Finch: Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic dialysis. New Engl.J.Med. 276: 655 (1967)

Eylar, E.H., M.A. Madoff, O.V. Brody, J.L. Oncly: Die Sialsäure der Erythrozyten ist auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert. J.Biol.Chem. 237: 1992 (1962)

Fairbanks, G., T.L. Steck, D.F.H. Wallach: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrozyte membrane. Biochem. 10: 2606-17 (1971)

Fairbanks, G.: The gel-elektrophorese technique Ph.D.Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass. (1969)

Falezza, G.C., R.Corrocher,F.Capra O. Olivieri, G.de Sandre,E. Treviso A. Pennacchioni: In vitro production of PNH-like red blood cells by 2-Mercapto-propionylglycine Acta Haematol. 64(6): 310-4 (1980)

Falezza, G.C., R. Corrocher, A. Pennacchioni, G. Aprili, G.de Sandre: Incorporation of radioactive choline into normal and PNH-like red cells, effect of Acetylcholinesterase inhibitors Haematologia (Pavia) 63(6): 667-74 (1978)

Feig, S.A., G. Gadotti: Relative deficiency of Ca-dependent ATP-activity of red cell membranes in Heriditary Spherocytosis. Biochem.Biophys.Res.Commun. 58: 487-94 (1974)

Feo, C.F., S. Fischer, J.P. Piau, M.J. Grange, G. Tchernia: First observation of a membrane protein deficienty (band-4,1) in a case of Heriditary Elliptocytosis. Nauv.Rev.Fr.Hematol. 22: 315-25 (1980)

Findlay, J.B.C.: The receptor proteins for Concanavalian-A and Lens Culinaris Phytohemagglutinin in the membrane of the human erythrocyte. J.Biol.Chem. 249: 4398-403 (1974)

Forth, W.: Arzneimittelallergie in: Handbuch der Pharmakologie und Toxikologie Hrsg. W.Forth, D.Henschler, W.Rummel 2. Aufl. S. 162 Mannheim, (1977)

Fujita, S., H. Cleve: Isolation and partial characterization of two minor glycoproteins from human erythrocyte membranes. Biochim.Biophys.Acta 382: 172-80 (1975)

Furthmayr, H.: Glycophorins A,B and C: A family of Sialoglycoproteins. Isolation and prelimiary characterization of Trypsin deprived peptides. J.Supramolecular Struct. 9: 79-95 (1978)

Furthmayr, H., V.T. Marchesi: Subunit structure of human erythrocyte Glycophorin-A. Biochem. 15(5): 1173 (1976)

Furthmayr, H., M. Tomita, V.T. Marchesi: Fractionation of the major Sialoglycopeptides of the human red blood cell membrane. Biochem.Biophys.Res.Commun. 65: 113-21 (1975)

Furthmayr, H., I. Kahne, V.T. Marchesi: Isolation of the major intrinsic transmembrane protein of the human erythrozyte membrane. J.Membr.Biol. 26: 173-87 (1976)

Gairdner, D., J. Maris, J.D. Roscoe: Blood formations in infancy: Normal erythropoiesis. Arch.Dis.Childhood 27: 214 (1952)

Ghamberg, C.G., S. Hakomori: External labeling of cell surfaces Galactose and Galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes. J.Biol.Chem. 248: 4311-17 (1973)

Giovannetti, S., P.L. Balestri, L.Cioni: Spontaneous in vitro autohaemolysis of blood from chronic uremic patients. Clin.Sci. 29: 407-16 (1965)

Glossmann, H., D.M. Neville Jr.: Glycoproteins of cell surfaces. J.Biol.Chem. 246: 6339-46 (1971)

Goldbloom, R.B., E. Fischer, D.Y. Hsia, J. Reinhold: Studies on the mechanical fragility of erythrocytes: Normal values for infants and children. Blood 8: 165 (1953)

Guidotti, G.: Membrane proteins. Ann.Rev.Biochem. 41: 731-52 (1972)

Hakomori, S., G.G. Strycharz: Investigations on cellular blood groups substances. Biochemistry 7: 1279-86 (1968)

Hause, L.L., S.M. Koethe, D.J. Rothwell, J.V. Straumfjord: Relations between surface change and in vitro lysis of red cells in PNH. Scand.J.Haematol. 20: 141-46 (1978)

Henkins, R.J., N.D. Levine, H.H. Sussman, M.H. Maxwell: Evidence of the presence of substances toxic for HeLa cells in the serum and in the dialysis fluid of patients with glomerulonephritis. J.Lab.clin.Med. 64: 79 (1964)

Holken, A.G., P.K. Marwah: Iatrogenic contribution to anemia of renal failure. Lancet 1971/1: 164 (1971)

Hollingworth, J.W.: Lifespan of fetal erythrocytes. J.Lab.clin.Med. 45: 469 (1955)

Horne,: Unveröffentlichte Ergebnisse. siehe: Rosse, W.F., J.P. Adams (1979)

Hsia, D.Y., R.B. Goldbloom, S.S. Gellis: Studies of the mechanical fragility of erythrocytes: Relation of physiologic jaundice of the newborn infant. Pediatrcs 13: 24 (1954)

Jenkins, R.E., M.J. Tanner: The major erythrocyte membrane protein Evidence for an S-shaped structure which traverses the membrane twice and contains a duplicated set of sites. Biochem.J. 147: 393-99 (1975)

Kaplan, E., K.S. Hsu: Determination of erythrocyte survival in newborn infants by means of Cr 51 labelled erythrocytes. Pediatrics 27: 354 (1961)

Keller, H.M.: Veränderungen der Erythrozyten und der roten Blutbildung bei Nierenkrankheiten. in: Handbuch der inneren Medizin Hrsg. von H.Schwiegk 5. Aufl. Bd. 8, S. 169 Berlin, Springer (1968)

Keyser, J.W.: Staining of serum glycoproteins after electrophoretic separation in acrylamid gels. Anal.Biochem. 9: 249 (1964)

Klemm, K.: Beeinflussung des hämolytischen Komplements bei Hämolyseversuchen mit Erythrocyten von Kranken mit PNH. Dissertation (1958)

Kletzien, R.F., J.F. Perdue, A. Springer: Cytochalasin A and B: Inhibition of sugar uptake in cultured cells. J.Biol.Chem. 247: 2964-66 (1972)

Köiw, E., A. Grönwall: Staining of protein bound carbohydrates after electrophoresis of serum on filter paper. Scand.J.Clin.Laborat.Invest.4: 244 (1952)

Kunstling, T.R., W.F. Rosse: Erythrocyte Acetylcholinesterase deficiency in PNH. A comparision of the complement. Sensitive and insensitive populations. Blood 33: 607 (1969)

Lasker, N., A. Harvey, H. Baker: Vitamin levels in hemodialysis and intermittent peritoneal dialysis. Trans.Amer.Soc.artif.intern.Org. 9: 51 (1963)

Laurent, C., P. Vereerstraeten, C. Toussoint, M. Wittek, J.P. Naets: Red cell life span, splenic sequestration and transfusion requirements in chronic renal failure treated hemolysis. Effect of bilateral nephrectomy. Clin.Nephrol. 2: 35 (1974)

Lee, Y.C., J.R. Scozca: A common structural unit in Asparagine oligosaccharides of several glycoproteins from different sources. J.Biol.Chem. 247: 5753-58 (1972)

Lewis, J.H., M.B. Zucker, J. Ferguson: Bleeding tendency in uremia. Blood 11: 1073 (1956)

Lichtman, M.A., D.R. Miller: Erythrocyte glycolysis, 2,3-diphospho-glycerate and ATP concentration in uremic subjects: relationship to extracellular phosphate concentration. J.Lab.clin.Med. 76: 267 (1970)

Liljas, L.: Aggregates of human erythrocyte membrane Sialoglycoproteins in the presence of Deoxycholate and Deoxysulfate. Biochem.Biophys.Acta 532: 347-53 (1978)

Lin, S., J.A. Spudich: Binding of Cytochalasin B to a red cell membrane protein. Biochem.Biophys.Res.Commun. 61: 1471-6 (1974)

Loge, J.P., R.D. Lange, C.V. Moore: Characterization of the anemia of chronic renal insufficiency. J.clin.Invest. 29: 830-1 (1950)

Lorant, L., G.E. Liefring, L. Loewe-Krentz: Enzymatic basis of membrane stiffening in human erythrocytes. Seminars in Hematol. 16: 65-74 (1979)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265 (1951)

Lux, S.E.: Spectrin-Actin membran skeletton of normal and abnormal red blood cells. Seminars in Hematol. 16: 21-51 (1979)

Lux, S.E., K.M. John, M.J. Kornovsky: Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice in irreversible sickled cells. J.clin.Invest. 58: 955-63 (1976)

Marchiafava, E.: Erste ausführliche Beschreibung der PNH.
Policlinico (sez. med.) 35: 109 (1928)

Marchesi, V.T.: Funktional proteins of the human red blood cell membrane.
Seminars in Hematol. 16: 3-20 (1979)

Markson, J.L., J.B. Rennie: The anemia of chronic renal insufficiency. The effect of serum from azotemic patients on the maturation of normoblasts in suspension cultures.
Scot.med.J. 1: 320 (1965)

Monsell, M., A.J. Grimes: Red and white cell abnormities in chronic renal failure.
Br.J.Haematol. 42(2): 169-74 (1979)

Morton, L.S.G., J.E. Garvin: Subunit structure of the major human erythrocyte glycoprotein: Depolimerization by heating ghosts with SDS.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 52: 1457-62 (1973)

Müller-Wiefel,D.E.: Bedeutung des gastrointestinalen Blutverlustes für die renale Anämie.
Dtsch.Med.Wochschr. 105: 1659-60 (1980)

Muirhead, E.E., J.A. Stirman, F. Jones, W. Lech: Hemolytic anemia of the dog following bilateral nephrectomy.
Amer.J.Phys. 173: 371 (1952)

Naets, J.P.: Erythropoiesis in nephrectomiced dog. Nature 181: 1134 (1958)

Nathan, D.G., C.L. Hampers, L.H. Beck, L. Button: Hematopoiesis in renal failure. Academic Press, New York S. 411 (1971)

Neerhout, R.G.: Erythrocyte lipids in the neonate. Pediat.Res. 2: 172 (1968)

Oski, F.A., M. Kamazawa: Metabolism of the erythrocytes of the newborn infant. Seminars Hemat. 12: 209-21 (1975)

Packman, C.H., S.I. Rosenfeld, Jenkins, A. Thiem, Jr. Patricia, J.P. Leddy: Complement lysis of human erythro- D.E.cytes differing susceptibility of two types of PNH cells to C5b-9. J.clin.Invest. 64: 428-33 (1979)

Palek, J.: Membrane Protein and Organization in normal and hemoglobinopathic Red Cells. Texas Reports on Biology and Medicine 40: 397-415 (1981)

Palek, J., S.C. Liu: Dependence of spectrin organization in red blood cell membranes on cell metabolism: Implications for control of red cell shape, deformability and surface area. Seminars in Hematol. 16: 75-94 (1979)

Palek, J., W.A. Curby, J.J. Lionetti: Relation of Ca 2+ activated ATP-ase to Ca 2+ linked shrinkage of human red cell ghosts. Am.J.Physiol. 220: 1028-32 (1971)

Parsons, L., M.E. Stralberg: Anemia in Azotemia. Amer.J.Med.Sci. 185: 181 (1933)

Pharmazia fine chemicals-Info-Schrift: Polyacrylamide Gel-Elektrophorese laboratory techniques. von Pharmazia Fine Chemicals (1980)

Pillemer, L., L. Blum, I.H. Lepow, O.A. Ross, E.W. Todd, A.C. Wardlaw: The Properdin system and immunity. Science 120: 279 (1954)

Puszkin, S., J. Muiman, E. Puszkin: Erythrocyte actin and spectrin interactions with muscle contractile and regulatory proteins. Biochim.Biophys.Acta 513: 205-20 (1978)

Ramjeesingh, M., S. Gninstein, A. Rothstein: Intrinsic segments of band-3 that are associated with anion transport across red blood cell membranes. J.Membr.Biol. 57: 95-102 (1980)

Rees, S.B., W.G. Scheitlin, J.C. Pond, I.J. Guild, Mc. Manus, J.P. Merrill: Effect of dialysis and purine ribo-sidesupon the anemia of uremia. J.clin.Invest. 36: 923 (1957)

Reichstein, E., R. Blostein: Arrangement of human erythrocyte membrane proteins. J.Biol.Chem. 250: 6256 (1975)

Reissmann, K.R., T. Nomura, R.W. Gunn, F. Brosius: Erythropoietic response to anemia orErythropoietin injection in anemic rats with or without functioniering renal tissue. Blood 16: 1411 (1960)

Rosenfeld, S.I., C.H. Packmann, D.E. Jenkins Jr., J.K. Countryman, J.P. Leddy: Complement lysis of human erythrocytes. J.Immunol. 125: 2063-8 (1980)

Rosse, W.F.: Interaction of complement with the red cell membrane. Seminars in Hematol. 16: 128-40 (1979)

Rosse, W.F., J.P. Adams: The membrane abnormities in PNH. Normal and abnormal Red Cell Membranes. S. 457-61 (1979)

Rosse, W.F., J.P. Adams, A.M. Thorpe The population of cells in PNH of intermediate sensitivity to complement lysis. Br.J.Haemat. 28: 181 (1974)

Rosse, W.F.: Variations in the red cells in PNH. Br.J.Haemat. 24: 327 (1973)

Rosse, W.F., J.V. Dacie: Immune lysis of normal human and PNH red blood cells. J.clin.Invest. 45: 736 (1966)

Rothstein, A., Z.I. Carbontchik, M. Balshin, R. Juliano: Enhancement of anion permeability in lecithin vesicles by hydrophobic proteins extracted from red blood cell membranes
Biochem.Biophys.Res.Commun. 64: 144-50 (1975)

Rouault, T., W.F. Rosse, J. Shelburne, S. Bell: Differences in the terminal steps of complement lysis of normal and PNH red cells.
Blood 51: 325-30 (1978)

Saccetti, C.: Physiologie des erythroblastes dans l anemie des azotemies chroniques.
Acta Haemat. (Basel) 9: 97 (1953)

Scarlett, E.P.: The significance of high anemia in chronic nephritis.
Amer.J.med.Sci. 178: 215 (1929)

Schulmann, I., C.H. Smith, G.S. Stern: Studies on anemia of prematurity.
Am.J.Dis.Child. 88: 567 (1954)

Schulz, E.: Erythropoietin im Serum und Harn bei chronisch Niereninsuffizienten im Stadium der kompensierten Retention unter hypoxischer Stimulation und Androgengabe.
Habil.-Schr., Köln (1972)

Schwarz, O.S., S.A. Motto: The diagnostic significance of "Burr" red blood cell.
Am.J.Med.Sci. 218: 563-6 (1949)

Seelmann, K.: Untersuchungen über die Erythropoiese beim Neugeborenen und jungen Säugling. Ztschr.Kinderh. 75: 189 (1954)

Segrest, J.P., R.L. Jackson, W. Terry, R.B. Guyer; V.T. Marchesi: Red cell membrane glycoprotein: Amino acid sequence of an intramembranous region. Biochem.Biophys.Res.Commun. 49: 964-9 (1972)

Shapiro, D.L., P. Pasqualini: Erythrocyte membrane proteins of premature and full term newborn infants. Pediatr.Res. 12: 176-8 (1978)

Shaw, A.B., M.C. Schales: Reticulocytosis in renal failure. Lancet 1967/1: 799 (1967)

Shaw, A.B.: Haemolysis in chronic renal failure. Briz.Med.J. 1967/2: 213-6 (1967)

Shin, B.C., K.L. Carraway: Lactoperoxydase labeling of erythrocyte membranes from the inside and outside. Biochim.Biophys.Acta 345: 141-53 (1974)

Shohet, S.B.: Spectrin und Spherocytosis. The New England Journal of Medicine 306: 1170-1 (1982)

Silverberg, M., V.T. Marchesi: The anomalous electric behaviour of the major sialoglycoprotein from the human erythrocyte. J.Biol.Chem. 253: 95-8 (1978)

Singer, S.J., G.L. Nicolson: The fluid mosaique model of the structure of cell membranes. Science 175: 720 (1972)

Sirchia, G., S. Ferrone, F. Mercuriali: The action of two Sulfhydryl compounds on normal human red cells, relationship to red cells of PNH. Blood 25: 502 (1965)

Sjölin, S.: The resistance of red cells in vitro. Acta Pediatr. (Suppl. 98) 43: 390 (1954)

Smith, B.D., P.L. la Celle: Parallel decrease of erythrocyte membrane deformability and spectrin solubility at low PH. Blood 53: 15-8 (1979)

Smith, C.H.: Blood changes during growth-postnatal period, infancy and childhood. Blood Diseases of Infancy and Childhood S. 13 (1972)

Springer, G.F., P.R. Desai: Common precursors of human blood group MN specificities. Biochem.Biophys.Res.Commun. 61: 470-5 (1974)

Steck, T.L., G. Dawson: Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane. J.Biol.Chem. 249: 2135-42 (1974)

Steck, T.L.: Cross-linking of the major proteins of the isolated erythrocyte membrane. J.Mol.Biol. 66: 295-305 (1972)

Steck, T.L., G. Fairbanks, D.F.H. Wallach: Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane, proteolytic dissection. Biochem. 10: 2617-24 (1971)

Steck, T.L., R.S. Weinstein, D.F.H. Wallach: Inside-out red cell membrane vesicles Preparation and purification. Science 168: 255-7 (1970)

Steck, T.L.: The organization of the human red blood cell membrane. J.Cell.Biol. 62: 1-19 (1974)

Stewart, J.H.: Haemolytic anemia in acute and chronic renal failure. Quarterly J.Med. (New Series) 34: (1967)

Strübing, P.: Paroxysmal haemoglobinuria. Dtsch.Med.Wschr. 8: 1, 17 (1882)

Sutherland, D.A., E.E. Muirhead, S.Mc Call, F. Jones: The anemia of uremia: Hemolytic state measured by the Radiochromium Method. Amer.J.Med. 19: 153 (1955)

Tanner, M.J.A., D.H. Boxer: Separation and some properties of the major proteins of the human erythrocyte membrane. Biochem.J. 129: 333-47 (1972)

Tanner, M.J.A., W.R. Grey: An assessment of Methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. Biochem.J. 125: 1109-17 (1971)

Thomas, D.B., R.J. Winzler: Structual studies on human erythrocyte glycoproteins. J.Biol.Chem. 244: 5943-6 (1969)

Tomita, M., V.T. Marchesi: Amino aci sequence and oligosaccharide attachement sites of human erythrocyte Glycophorin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72: 2964-8 (1976)

Travis, S.F., S.P. Kumar, M.D. Papadopulos: Red cell metabolic alteration in postnatal life in term infants. Pediatr.Res. 15: 34-7 (1981)

Triplett, R.B., K.L. Carraway: Proteolytic digestion of erythrocytes, released ghosts and isolated membranes. Biochem. 11: 2897-903 (1972)

Wang, K., F.M. Richards: An approach to nearest neighbour analysis of membrane proteins. J.Biol.Chem. 249: 8005-18 (1974)

Weinstein, R.S., J.K. Khodadad, T.L. Steck: Ultrastructural characterization of proteins at the natural surfaces of the red cell membrane. The Red Cell: 413-27 (1978)

Wellhöner, H.H.: Auslösung hämolytischer Anämien durch Pharmaka. in: Handbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Hrsg. H.H. Wellhöner 2. Aufl. S. 101 Heidelberger Taschenbücher Bd. 169 (1976)

Winzler, R.J.: The position of PAS-1,2 proteins in the erythrocyte membrane. in: Red Cell Membrane Structure and Function. Hrsg. G.A. Jamieson, T.J. Greenwalt, P.P. Lippinscott Philadelphia, S. 157-71 (1969)

Yachnin, S., M.T. Laforet, F.H. Gardner: PH dependent hemolytic systems: Their relationship to PNH. Blood 17: 83 (1961)

Zavagli, G., G.D. Grusovin, G.P. Guidetti: Survival and significance of PNH erythrocytes: A scanning study. Acta Haematol. (Basel) 59: 293-301 (1978)

Zipursky, A.: THe erythrocytes of the newborn infant. Seminars in Hematol. 2: 167 (1965)

Zoconi, S., S. Sjölin: Survival of Cr51 labelled red cells from newborn infants. Acta Paediat. (Suppl.117) 48: 18 (1959)

Zwaal, R.F.A., H.C. Hemker: Blood cell membranes and haemostasis. Haemostasis 11: 12-39 (1982)

Anschließend möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schneider für das interressante Thema bedanken.
Frl. Freiberger bin ich wegen ihrer freundlichen Hilfe bei den alltäglichen Problemen im Labor, Frau Volmer für das Photographieren der Gele und meiner Mutter und Schwester für das aufmerksame Korrekturlesen zu Dank verpflichtet.

Martin Sonnenberg
Buschstr.23
4630 Bochum 6

Lebenslauf

Ich, Martin Sonnenberg, bin am 22.3.57 in Bochum als Sohn des Bewährungshelfers Benno Sonnenberg und seiner Ehefrau Rosemarie geb. Schwede geboren. Von 1962 bis 1967 besuchte ich die Liboriusschule in Bochum. Die ersten zwei Jahre des Gymnasiums absolvierte ich auf der Freiherr vom Stein Schule. Von da an bis zum Abitur am 23.6.76 blieb ich auf dem Goethe-Gymnasium in Bochum.
Anschließend studierte ich bis zum Physikum am 11.9.1978 an der Universität Bochum Medizin. Das erste Staatsexamen am 30.8.1979 und das zweite Staatsexamen am 21.8.1981 habe ich an der Universität Düsseldorf bestanden.
Ebenso begann ich dort 1979 mit meiner Doktorarbeit. Den experimentellen Teil konnte ich 1981 beenden. Im Augenblick leiste ich im Lukas-Krankenhaus in Neuss das praktische Jahr ab und bereite mich gleichzeitig auf das dritte medizinische Staatsexamen vor.

Düsseldorf, den 29.8.1982